昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, December 2012, 55(12): 1345 – 1354　　ISSN 0454-6296

白背飞虱中的 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 双重感染特性

张开军，朱文超，刘　静，丁秀蕾，荣　霞，洪晓月*
（南京农业大学昆虫学系，南京 210095）

摘要：为了明确自然种群白背飞虱 *Sogatella furcifera* 中 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 的感染情况以及 *Wolbachia* 与其特有的 WO 噬菌体之间的关系，以采自中国 7 个省区 9 个地点的白背飞虱为研究材料，运用 PCR 检测的方法调查了 *Wolbachia*，*Cardinium* 以及 WO 噬菌体在各飞虱种群中的感染率和组织分布特点。结果表明：白背飞虱广泛双重感染 *Wolbachia* 和 *Cardinium*，并且都表现出很高的感染率。白背飞虱各种群 *Cardinium* 的感染率几乎均为 100%；*Wolbachia* 的感染率也较高，但雌雄虫感染率差异较大，雌虫的感染率几乎均为 100%，而雄虫的感染率从 22.2% ~ 95.0% 不等。另外，通过不同 DNA 聚合酶、不同提取方法的对比，揭示了 DNA 粗提样品在基于 PCR 技术的胞内共生菌检测中的不足之处。对白背飞虱头部、胸部、腹部、足和翅 5 个不同部位组织的检测结果表明，不仅在含有生殖组织的腹部有这两类共生菌的感染，在其他非生殖组织中同样也感染了这两类共生菌；虽然 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 在寄主的各个组织中均有分布，但是两者在白背飞虱成虫（尤其是雄虫）阶段的动态变化有明显的差异。进一步对 *Wolbachia* 宿主特异性 WO 噬菌体的检测结果表明，自然种群雄虫中 *Wolbachia* 的感染率与不感染个体中 WO 噬菌体的比率呈明显的负相关。因此推测，雄虫中 *Wolbachia* 感染率相对较低的原因可能是由于 *Wolbachia* 基因组中溶原性的 WO 噬菌体受到某种因素的诱导已转化为裂解性噬菌体。研究结果为进一步揭示 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 双重感染条件下对寄主的生殖调控作用及其机制、垂直传播规律、两者之间的相互关系以及进一步的应用研究等方面提供了重要的理论基础。

关键词：白背飞虱；*Wolbachia*；*Cardinium*；WO 噬菌体；双重感染；感染率
中图分类号：S476.11　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2012)12-1345-10

Double infection of *Wolbachia* and *Cardinium* in the whitebacked planthopper, *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae)

ZHANG Kai-Jun, ZHU Wen-Chao, LIU Jing, DING Xiu-Lei, RONG Xia, HONG Xiao-Yue*
(Department of Entomology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In order to reveal the infection characteristics of bacterial endosymbionts *Wolbachia* and *Cardinium* in natural populations of *Sogatella furcifera* (Horváth) and the relationship between *Wolbachia* and bacteriophage WO, we used PCR method to detect the infection rates and tissue distribution of these bacteria and phage in various *S. furcifera* populations which were collected from nine localities in seven provinces and regions of China. The results revealed that the double infection of *Wolbachia* and *Cardinium* was a common event in this insect with each population tested having a high infection rate. For *Cardinium*, the infection rate was nearly 100%, but for *Wolbachia*, the infection rates of females and males were quite different, nearly 100% in females while ranged from 22.2% – 95.0% in male adults. In addition, by comparing the detection results using different DNA extraction methods and DNA polymerase, we found that the rough DNA extraction method has evident disadvantages in surveying the endosymbiont infection. *Wolbachia* and *Cardinium* existed not only in the germinal tissues of *S. furcifera* but also in non-reproductive tissues/parts such as head, thorax, legs and wings. Meanwhile, these two endosymbionts exhibited different change patterns during the adult stage, particularly in males. There existed an obvious negative correlation between the infection rates of *Wolbachia* and the rates of bacteriophage WO detected from uninfected individuals in males. The lower *Wolbachia* infection rate in males might be caused by the transition of WO phage from lysogenic to lytic type under the induction of certain factors. The results of this study will shed light on further understanding of the reproductive

基金项目：国家公益性行业（农业）科技项目(200803003, 200903051)；教育部博士点基金优先发展领域项目(20110097130005)
作者简介：张开军，男，1983 年生，江苏淮安人，博士研究生，从事昆虫分子生态学及昆虫胞内共生菌研究，E-mail: kjzhangcn@gmail.com
* 通讯作者 Corresponding author, Tel.: 025-84395339; E-mail: xyhong@njau.edu.cn
收稿日期 Received: 2012-10-29；接受日期 Accepted: 2012-12-16

manipulation and underlying mechanisms of *Wolbachia* and *Cardinium*, their vertical transfer, interrelationship and their potential utilization.

Key words: *Sogatella furcifera*; *Wolbachia*; *Cardinium*; bacteriophage WO; double infection; infection rate

Wolbachia 属于 α 变形菌纲(Alphaproteobacteria),立克次氏体目(Rickettsiales),无形体科(Anaplasmataceae),是一类广泛存在于节肢动物体内并能通过细胞质遗传的细胞内共生菌(Werren *et al.*, 1995),它在昆虫中的感染率高达 76% (Jeyaprakash and Hoy, 2000)。除了昆虫,*Wolbachia* 还能够感染线虫(Bandi *et al.*, 1999)以及甲壳动物、螨等多种节肢动物宿主(Breeuwer and Jacobs, 1996; Stouthamer *et al.*, 1999)。在不同的节肢动物宿主中,*Wolbachia* 能够引发宿主多种生殖异常行为,包括胞质不亲和(cytoplasmic incompatibility, CI)(Bourtzis *et al.*, 1999)、诱导孤雌生殖(parthenogenesis inducing, PI)(Stouthamer *et al.*, 1993)、雌性化(feminization)(Rigaud *et al.*, 1991)和杀雄(male-killing)(Hurst, 1991)等。*Cardinium* 是另一类最近才被人们发现和关注的细胞内共生细菌,属于拟杆菌门(Bacteroidetes)的一个独立分支,同 *Wolbachia* 一样可以通过细胞质遗传(Zchori-Fein *et al.*, 2001)。根据已有的文献报道,*Cardinium* 的寄主范围覆盖了节肢动物中蛛形纲中的 6 个目,在昆虫纲中主要分布于膜翅目、半翅目和双翅目(张开军等, 2010)。许多研究表明 *Cardinium* 同样具有诱导寄主生殖异常现象的能力(Weeks *et al.*, 2001; Zchori-Fein *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2012)。目前国内外学者对 *Cardinium* 的研究还相对较少,对同时感染不同胞内共生菌的研究更少。胞内共生菌引起的生殖调控作用能够给感染的雌虫提供生殖优势,从而有利于其在寄主种群中的维持和扩散(Hoffmann and Turelli, 1997)。此外,胞内共生菌除了能直接影响寄主的生殖,还和寄主的许多其他生物学习性(营养、发育、寿命、免疫等方面)息息相关(Chevalier *et al.*, 2011)。

随着对 *Wolbachia* 研究的深入,其生殖调控作用被越来越多地应用于有害生物的控制研究。大量的研究表明,在实验室条件下利用显微注射技术能够成功地实现 *Wolbachia* 在不同寄主之间的水平转染(Braig *et al.*, 1994; Grenier *et al.*, 1998; Xi *et al.*, 2006; Ruang-areerate and Kittayapong, 2006)。例如,McMeniman 等(2009)经过长期的研究积累,成功地将黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中能够缩短寄主寿命的 *w*MelPop 株系的 *Wolbachia* 转入登革热病毒媒介昆虫埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 体内;研究还发现,这一株系的 *Wolbachia* 不仅能够在埃及伊蚊种群中稳定的遗传,而且能引起高度的 CI,这些特性能够促使感染个体在自然种群中的扩散,最终实现种群的替换;更加有意义的是,这种株系的 *Wolbachia* 同样能够使感染的埃及伊蚊寿命缩短为自然个体的一半,这极大地降低了感染成虫传播登革热病毒的能力(登革热病毒的体外潜伏期通常需要 2 周左右)。野外释放研究结果表明,这些人工转染的埃及伊蚊释放几个月后能够成功地实现对野外不感染种群的替换(Hoffmann *et al.*, 2011)。因此,人工转染 *Wolbachia* 成为控制埃及伊蚊和登革热病毒传播的一项有效的手段。这些研究结果也为利用胞内共生菌控制农作物有害生物的研究提供了新的思路。

人工转染 *Wolbachia* 能够成功作为一种用于控制有害生物的防治方法,其比较关键的前提是 *Wolbachia* 能够在新寄主中稳定存在并能够顺利遗传给后代。自 Masui 等(2000)在地中海粉斑螟 *Ephestia kuehniella* 感染的 *Wolbachia* 中发现有着宿主特异性的 WO 噬菌体以来,WO 噬菌体就被认为是能够影响 *Wolbachia* 密度及其垂直遗传效率的一个重要因子,并且被越来越多的学者关注。许多研究表明,在 *Wolbachia* 基因组中不仅广泛存在溶原性的噬菌体(WO 噬菌体的基因组插入到 *Wolbachia* 基因组中,不产生子代噬菌体,但能随着细菌基因组的复制而复制)(Kent *et al.*, 2011),而且某些物种中 WO 噬菌体能受到一些因素的诱导由溶原性转化为裂解性噬菌体(WO 噬菌体受到一些因素诱导脱离 *Wolbachia* 基因组进入裂解周期,从而在 *Wolbachia* 细胞内复制增殖,产生许多子代 WO 噬菌体,并最终裂解 *Wolbachia*)(Biliske *et al.*, 2011; Bordenstein and Bordenstein, 2011)。由于 *Wolbachia* 诱导 CI 的强度与 *Wolbachia* 的密度存在着一定的相关性(Bordenstein *et al.*, 2006),而 WO 噬菌体又影响着 *Wolbachia* 的密度,因此寄主、*Wolbachia* 和 WO 噬菌体三者之间的关系也引起了很多学者的关注(Bordenstein *et al.*, 2006; Chafee *et al.*, 2011)。

白背飞虱 *Sogatella furcifera* (Horváth)属半翅目飞虱科，是亚洲地区一种重要的远距离迁飞性水稻害虫，严重威胁水稻生长，致使稻谷产量大幅度降低，造成较大的经济损失。对白背飞虱、灰飞虱以及褐飞虱中 *Wolbachia* 感染情况的初步测定、生殖调控作用和系统发育分析等方面已有一些研究报道(Noda *et al*., 2001；甘波谊等，2002；Kittayapong *et al*., 2003；Zhang *et al*., 2010, 2012a)。本研究通过分子检测的方法对采自我国多个地区的白背飞虱感染 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 的情况做了系统的调查，同时解剖获取成虫的头、胸、腹、足和翅 5 个组织进行详细的检测，并进一步揭示了白背飞虱中 *Wolbachia* 与 WO 噬菌体之间的相关性，以明确这两类共生菌在白背飞虱自然种群中的感染特性。明确这两类胞内共生菌在寄主体内的分布特点、垂直传播规律及遗传特性，可为进一步研究和利用这两类具有生殖调控作用的共生菌控制稻飞虱等有害生物奠定基础。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

供试白背飞虱于 2010 - 2012 年分别采自中国海南、广西、云南、福建、贵州、湖北、甘肃 7 个省区 9 个地点(表 1)。将采集到的白背飞虱成虫置于 100% 乙醇中保存，带回实验室立即用于实验或 -20℃保藏备用。

表 1　实验中所用白背飞虱成虫样本的采集信息

Table 1　Collection data of *Sogatella furcifera* adult samples used in this study

种群代码 Population code	采集地点 Locality	经纬度 Geographic coordinate	采集时间 Collecting time
SY	海南三亚 Sanya, Hainan	18.14°N, 109.31°E	2010.08.17
KM	云南昆明 Kunming, Yunnan	24.96°N, 102.50°E	2011.07.25
LY	福建龙岩 Longyan, Fujian	25.06°N, 116.42°E	2011.07.15
XA	广西兴安 Xing'an, Guangxi	25.37°N, 110.40°E	2011.07.19
DL	云南大理 Dali, Yunnan	25.63°N, 100.20°E	2011.07.26
GY	贵州贵阳 Guiyang, Guizhou	26.63°N, 106.82°E	2011.07.24
SY	海南三亚 Sanya, Hainan	11.53°N, 110.05°E	2012.08.14
BS	云南保山 Baoshan, Yunnan	25.15°N, 99.22°E	2012.08.18
XA	广西兴安 Xing'an, Guangxi	25.37°N, 110.40°E	2012.08.31
DL	云南大理 Dali, Yunnan	25.62°N, 100.31°E	2012.08.18
XG	湖北孝感 Xiaogan, Hubei	30.86°N, 113.97°E	2012.08.26
JY	甘肃靖远 Jingyuan, Gansu	36.57°N, 104.67°E	2012.07.23

1.2 白背飞虱 DNA 的提取

采集的白背飞虱用 100% 乙醇清洗 6 遍以上，待乙醇完全挥发后用于 DNA 的提取。采用两种提取方法。提取方法 1：参照 O' Neill 等(1992)的方法，并加以改进。具体步骤如下：向事先已编号的 1.5 mL 离心管内分别加入 40 μL STE 缓冲液(100 mmol/L NaCl，10 mmol/L Tris-HCl，1 mmol/L EDTA，pH 8.0)，然后将离心管置于冰上；在体视镜下挑取体表无明显寄生物的单头白背飞虱放入离心管内，立即用一次性组织研磨杵充分碾磨，碾磨后将离心管置于冰上；分别向离心管内加 3 μL 蛋白酶 K(10 mg/mL，Femenstal)，37℃孵育 1 h；95℃变性 5 min；4 000 g 离心 1 min 后，-20℃保存或直接用作 PCR 反应的模板，立即进行 PCR 扩增。提取方法 2：采用 Promega 试剂盒 Wizard® Genomic DNA Purification Kit 单头提取白背飞虱 DNA，具体操作方法参照试剂盒使用说明书。

1.3 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 感染率的检测

使用 Zhou 等(1998)根据 *Wolbachia wsp* 基因序列设计的一对特异性引物，扩增该基因一段长度为 599 bp 的片段以检测 *Wolbachia* 的感染情况，上游引物为：5′-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3′；下游引物为：5′-AAAAATTAAACGCTACTCCA-3′。*Cardinium* 的检测使用一对特异性的引物扩增出一段长度为 450 bp 左右的 16S rRNA 基因的片段(Weeks *et al*., 2003)，上下游引物分别为 CLOf(5′-GCGGTGTAAAATGAGCGTG-3′) 和 CLOr1 (5′-ACCTMTTCTTAACTCAAGCCT- 3′)。

针对 DNA 粗提样品，PCR 反应分别采用普通 Taq DNA Polymerase 和 MightyAmp DNA Polymerase (对含有 PCR 阻害物的粗提样品具有很好的扩增能力)两种 DNA 聚合酶方法进行检测。检测方法 1：普通 Taq DNA Polymerase PCR 反应体系为：3 μL DNA 模板、2.5 μL 10 × Buffer、2.5 μL $MgCl_2$(25 mmol/L)、2.5 μL dNTPs(2.5 mmol/L)、0.2 μL Taq DNA Polymerase(5 U/μL，TaKaRa)、上下游引物各 0.5 μL(20 μmol/L each)加 ddH_2O 至 25 μL；反应条件为：95℃ 3 min；95℃ 30 s，55℃ (*Wolbachia*)/57℃(*Cardinium*)30 s，72℃ 45 s，35 个循环；72℃ 5 min；4℃ 保存。检测方法 2：MightyAmp DNA Polymerase PCR 反应体系为：3 μL DNA 模板、12.5 μL 10 × Buffer、0.5 μL MightyAmp DNA Polymerase(1.25 U/μL，TaKaRa)、上下游引物(20 μmol/L)各 0.5 μL，加 ddH_2O 至 25 μL；PCR 反应条件为：98℃ 2 min；98℃ 10 s，60℃ 15 s，68℃ 45 s，35 个循环；4℃ 保存。采用一对特异性引物(Simon *et al*., 1994)：12Sai (5′-AAACTAGGATTAGATACCCTATTAT-3′) 和 12Sbi (5′-AAGAGCGACGGGCGATGTGT-3′)扩增白背飞虱 12S rRNA 基因片段用于检测阴性样品 DNA 提取质量。每个种群检测成虫的个体数从 13 ~ 142 头不等(表 2)。

1.4 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 在白背飞虱不同组织中的分布检测

挑选采自广西兴安、贵州贵阳、海南三亚 3 个种群的白背飞虱，在解剖镜下用经过消毒灭菌的手术刀片将成虫虫体解剖为头部、胸部、腹部、足以及翅 5 个不同部位组织。每个种群雌、雄虫分别解剖检测3 ~ 6 头，将解剖好的虫体每个组织放入编好号的 1.5 mL 离心管内，提取 DNA，对各组织中 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 的感染情况进行 PCR 检测，检测方法同上。

1.5 WO 噬菌体的检测

对 2012 年采集的 6 个白背飞虱种群中的雄虫进行 WO 噬菌体的检测。采用编码 WO 噬菌体外壳蛋白小亚基的 *orf7* 基因作为靶标基因，上下游引物分别为 orf7F (5′-GTCTGGAAAGCTTACAAAAAG-3′)和 orf7R (5′-CTCGCCAAAATATAGCCCTGC-3′) (周丽丽等，2010)，扩增产物片段的长度为 125 bp。PCR 反应体系同上；反应条件为：95℃ 3 min；95℃ 30 s，58℃ 30 s，72℃ 45 s，35 个循环；72℃ 5 min；4℃保存。

取 PCR 反应产物 10 μL，在浓度为 1.5% 的琼脂糖凝胶上 120 V 电压电泳检测，在 Gel Doc EQ 凝胶成像系统(Bio-Rad，Hercules，CA)下观察并记录结果。阳性对照为已检测过的确定为 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 双重感染的白背飞虱提取的 DNA；阴性对照为水。每个种群检测雄虫个体数从 16 ~ 40 头不等(表 2)。

1.6 数据统计与分析

根据 PCR 产物的电泳检测结果，统计 *Wolbachia*，*Cardinium* 以及 WO 噬菌体的感染情况，将统计的结果输入到 SPSS 软件中，采用 Spearman 方法进行相关性分析。

表 2 白背飞虱中 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 感染情况

Table 2 The infection status of *Wolbachia* and *Cardinium* in *Sogatella furcifera*

种群代码（检测成虫个体数）Population code (number of adults checked)	采集时间 Collection time	DNA 提取方法[a] DNA extraction method	检测方法[b] Detection method	*Wolbachia* 感染率（%）*Wolbachia* infection rate			*Cardinium* 感染率（%）*Cardinium* infection rate			双感染率（%）Double infection rate		
				雌 Female	雄 Male	总感染率 Total	雌 Female	雄 Male	总感染率 Total	雌 Female	雄 Male	总感染率 Total
SY（72♀，72♂）	2010.08.17	1	1	83.3	47.2	72.2	97.2	97.2	97.2	83.3	47.2	65.3
KM（48♀，48♂）	2011.07.25	1	1	85.4	43.8	64.6	56.3	70.8	63.5	56.3	27.1	41.7
			2	100	87.5	93.8	97.9	100	99.0	97.9	87.5	92.7
LY（13♀）	2011.07.15	1	1	100	–	–	100	–	–	100	–	–
			2	100	–	–	100	–	–	100	–	–
XA（30♀，30♂）	2011.07.19	1	1	13.3	33.3	23.3	86.7	86.7	86.7	13.3	33.3	23.3
			2	100	36.7	68.3	100	100	100	100	36.7	68.3
DL（22♀，20♂）	2011.07.26	1	1	9.1	55.0	31.0	90.9	35.0	64.3	9.1	25.0	16.7
			2	100	95.0	97.6	100	95.0	97.6	100	90.0	95.2
GY（28♀，31♂）	2011.07.24	1	1	89.3	41.9	64.4	92.9	100	96.6	89.3	41.9	64.4
			2	100	61.3	79.7	100	100	100	100	61.3	79.7
SY（40♀，40♂）	2012.08.14	2	1	100	42.5	71.3	100	100	100	100	42.5	71.3
BS（34♀，27♂）	2012.08.18	2	1	97.1	48.1	75.4	100	100	100	97.1	48.1	75.4
XA（36♀，36♂）	2012.08.31	2	1	97.2	30.6	63.9	100	100	100	97.2	30.6	63.9
DL（28♀，16♂）	2012.08.18	2	1	100	68.8	88.6	96.4	100	96.4	96.4	68.8	86.4
XG（36♀，36♂）	2012.08.26	2	1	91.7	22.2	56.9	100	100	100	91.7	22.2	56.9
JY（23♀，23♂）	2012.07.23	2	1	100	26.1	63.0	100	100	100	100	26.1	63.0

[a]DNA 提取方法 DNA extraction method：1：粗提法 Crude extraction method；2：DNA 试剂盒提取法 Extracting DNA using DNA Purification Kit. [b]检测方法 Detection method：1：Taq Polymerase PCR；2：MightyAmp DNA Polymerase PCR. –：无相应数据 No data available.

2 结果与分析

2.1 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 在白背飞虱中的感染情况

PCR 检测结果表明，采自不同地点的白背飞虱种群中无论是雌虫还是雄虫 *Cardinium* 都表现出非常高的感染率(几乎都达到了 100%)，只有极少数个体不感染(在本研究中每个种群都不超过 2 头)。*Wolbachia* 的感染率在白背飞虱不同性别间却表现出较大的差异，雌虫的感染率远高于雄虫，雌虫几乎 100% 感染 *Wolbachia*，而雄虫的感染率相对较低，感染率从 22.2% ~95.0% 不等(表 2)。利用两种不同的 DNA 聚合酶进行 PCR 检测两类胞内共生菌感染情况，结果显示，由于 DNA 粗提样品中有 PCR 抑制物质的存在，用普通 Taq DNA 聚合酶进行的 PCR 检测得到的感染率与真实感染率有较大的出入，整体上低于真实感染率，不能真实反映寄主的感染情况，有碍于对科学问题的揭示。例如，2011 年采集的白背飞虱中，兴安、贵阳种群中 *Cardinium* 实际上都是 100% 感染，而普通 Taq 酶检测的感染结果明显出入较大。同样，同批采集的昆明、兴安、大理、贵阳种群中，雌虫 *Wolbachia* 的感染情况实际上也是 100% 感染。

2.2 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 在白背飞虱不同组织中的分布

将采自不同地点的白背飞虱雌雄虫解剖成 5 个不同部位组织，进行 PCR 检测，去除单感染 *Cardinium* 和不感染的个体，挑选双重感染代表性的检测结果(图 1)。结果表明，白背飞虱成虫解剖的 5 个不同部位组织中都有 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 的分布(图 1：A，B)。在雌虫中，头、胸、腹和足中基本都能检测到这两类胞内共生菌。部分雌虫的翅中检测不到(图 1：A)可能是由于 DNA 的丰度过低或者发生了丢失。对于雄虫，*Wolbachia* 相比 *Cardinium* 更多地在一些个体的非生殖组织中检测不到，尤其是足和翅，有的雄性双重感染个体甚至只能在腹部检测到 *Wolbachia*(图 1：B)。推测可能是因为这两类胞内共生菌的数量在成虫的发育过程中会发生下降甚至完全丢失。

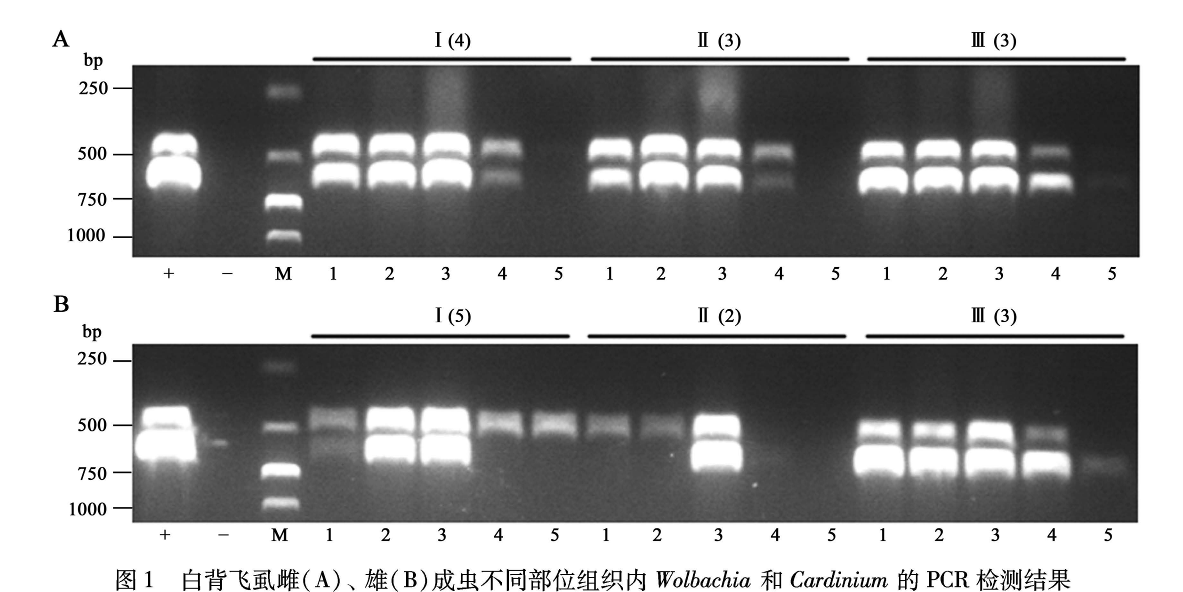


图 1 白背飞虱雌(A)、雄(B)成虫不同部位组织内 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 的 PCR 检测结果

Fig. 1 The distribution of *Wolbachia* and *Cardinium* in different parts/tissues of female (A) and male (B) adults of *Sogatella furcifera* by PCR detection

+：阳性对照(双重感染 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 的个体) Positive control (*Wolbachia* and *Cardinium* doubly infected individuals)；−：阴性对照(双蒸水) Negative control (ddH_2O)；M：DNA 分子量标准 DNA marker；1：头 Head；2：胸 Thorax；3：腹部 Abdomen；4：足 Legs；5：翅 Wings. 罗马数字表示不同的重复；括号中的数字表示解剖的个体数。Roman numerals mean the different replicates, and the numeral in parenthesis means the number of individuals dissected.

2.3 白背飞虱雄虫中 *Wolbachia* 和 WO 噬菌体的相关性

在未检测到 *Wolbachia* 的白背飞虱雄虫中，WO 噬菌体的检测结果分为 3 种类型(图 2：A)：PCR 检测电泳条带很亮、电泳条带较弱、无条带。不同自然种群检测结果表明，有 3 个种群(大理、保山、

靖远）不感染 *Wolbachia* 的雄虫都能检测到 WO 噬菌体；在另外 3 个种群（三亚、兴安、孝感）中，有绝大部分不感染个体都能检测到 WO 噬菌体，只有小部分个体检测不到（图 2：B）。相关性分析结果表明，白背飞虱雄虫不感染 *Wolbachia* 个体中检测到 WO 噬菌体的比率和 *Wolbachia* 感染率呈明显的负相关（图 2：C，$R^2 = 0.6753$，由于孝感种群中没有检测到 WO 噬菌体的比率较高，去掉该组数据后 $R^2 = 0.9566$）。雄虫中 *Wolbachia* 感染率相对较低的原因可能是由于 *Wolbachia* 基因组中溶原性的 WO 噬菌体受到某种因素的诱导已转化为裂解性噬菌体。通过对比雌雄虫 *Wolbachia* 感染率的显著差异性，我们推测这种诱发机制与宿主的性别相关。

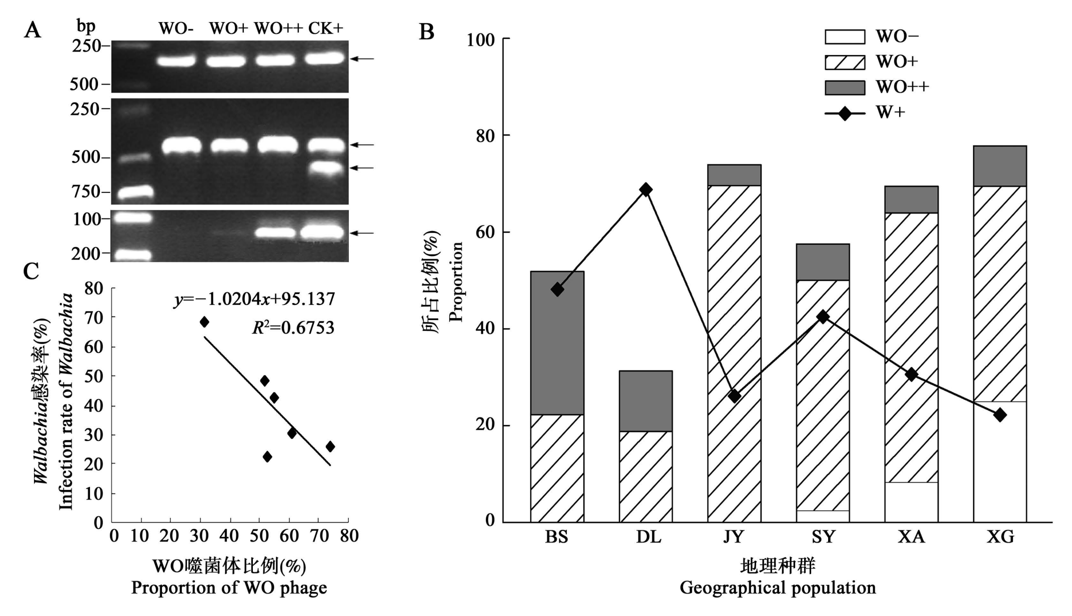


图 2　白背飞虱雄虫中 WO 噬菌体的感染及其与 *Wolbachia* 感染率的相关性分析

Fig. 2　The infection of WO phage in males of *Sogatella furcifera* and the correlation analysis between the infection rate of *Wolbachia* and the proportion of WO phage

A：WO 噬菌体检测结果类型示意图 Schematic diagram of detecting result types of WO phage. WO－：未检测到 WO 噬菌体的个体 Individuals in which no detected signal of WO phage；WO＋：WO 噬菌体检测信号较弱的个体 Individuals in which the detected signal of WO phage is weak；WO＋＋：WO 噬菌体检测信号很强的个体 Individuals in which the detected signal of WO phage is strong；CK＋：阳性对照（双重感染 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 的个体）Positive control（*Wolbachia* and *Cardinium* doubly infected individuals）. 箭头指示条带的检测对象从上到下依次表示 12S rDNA，*Cardinium*，*Wolbachia* 和 WO 噬菌体。The detected objects of each band indicated by arrows from top to bottom are 12S rDNA，*Cardinium*，*Wolbachia*，and WO phage，respectively. B：各种群雄虫中 WO 噬菌体及 *Wolbachia* 的检测结果 Detecting results of WO phage and *Wolbachia* in males of different populations. WO－：未检测到 WO 噬菌体 No detected signal of WO phage；WO＋：WO 噬菌体检测信号较弱 Detected signal of WO phage is weak；WO＋＋：WO 噬菌体检测信号很强 Detected signal of WO phage is strong；W＋：*Wolbachia* 感染率 Infection rate of *Wolbachia*. C：雄虫中 *Wolbachia* 感染率与不感染个体中检测到 WO 噬菌体比例之间的相关性分析 Correlation analysis of infection rates of *Wolbachia* and the proportions of WO phage detected from uninfected males.

3　讨论

虽然 *Cardinium* 的寄主分布范围比 *Wolbachia* 要窄的多（Jeyaprakash and Hoy，2000；Weeks *et al*.，2003），但是 *Cardinium* 同 *Wolbachia* 一样能够引起寄主的生殖异常现象（Weeks *et al*.，2001；Zchori-Fein *et al*.，2001；Harris *et al*.，2010；Zhu *et al*.，2012）。在严重危害水稻的几种主要飞虱（褐飞虱、灰飞虱和白背飞虱）中，目前只发现白背飞虱有 *Cardinium* 和 *Wolbachia* 双重感染现象的存在（Zhang *et al*.，2012a）。这为我们研究和利用两种或者多种胞内共生菌共同控制农业害虫提供了很好的研究材料。本研究通过系统的调查，明确了白背飞虱中这两种胞内共生菌的感染情况。揭示白背飞虱中这两种胞内共生菌的感染特性对进一步研究单独感染一种以及双重感染情况下这两类胞内共生菌的生殖调控作用、对寄主生物学习性的影响以及胞内共生菌

在自然环境下在寄主种群中的传播规律等其他方面有着重要的指导作用。本研究在揭示这两类胞内共生菌在白背飞虱中的真实感染情况的同时，通过利用两种不同特性的 DNA 聚合酶分别检测 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 的感染情况，比较并揭示了普通 Taq DNA 聚合酶在针对小型昆虫简易方法粗提的 DNA 样品时存在的不足之处。这对准确检测揭示胞内共生菌在其他体型较小的节肢动物中的感染特性以及垂直传播规律的研究有一定的参考价值。对于小型昆虫及其他节肢动物的 DNA 粗提样品检测结果假阴性的主要原因可能有以下两点：一是由于粗提 DNA 样品中 PCR 抑制物的存在导致 PCR 失败；另一个原因可能是靶标 DNA 的丰度太低。有研究表明，不同日龄成虫中 *Wolbachia* 的量有较大的差异（Min and Benzer, 1997；Zhang *et al*., 2010）。简易方法提取 DNA 在针对较大数量样本时有一定的优势，因此在不改进 DNA 提取方法的前提下，选用抗 PCR 抑制物和扩增灵敏度高的 DNA 聚合酶也可以提高检测结果的准确性。

不同的 *Wolbachia* 株系在不同的寄主中有着不同的分布特性。比如，多种果蝇、尖音库蚊 *Culex pipiens*、干果斑螟、刺舌蝇雄虫等节肢动物中 *Wolbachia* 在寄主各个组织中都有分布，而在刺舌蝇雌虫、部分白纹伊蚊种群中 *Wolbachia* 只局限在生殖组织中（Dobson *et al*., 1999）。有些能为寄主提供营养物质的 *Wolbachia* 株系甚至会以含菌胞的形式存在于寄主体内（Hosokawa *et al*., 2010）。目前关于 *Cardinium* 的研究很少涉及到在寄主不同组织中的分布趋向性。明确胞内共生菌在寄主不同组织中的分布情况有助于阐明胞内共生菌的垂直传播规律。本文的研究结果有力地证明了胞内共生菌 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 在白背飞虱中的分布不仅仅局限在生殖组织中，在非生殖组织中同样也有分布。这意味着这两类胞内共生菌可能还具有除了调控寄主生殖行为以外的其他功能。不同组织中都有这两类胞内共生菌的分布以及后代极高的感染率说明了在白背飞虱胚胎发育的过程中，这两类胞内共生菌能够随着受精卵细胞的分裂分布于不同的胚胎细胞中。研究表明，*Wolbachia* 能够有效地附着在微管上是保证有丝分裂时 *Wolbachia* 能随着染色体的分离而成功地分配到每一个子细胞中的一个重要原因（Ferree *et al*., 2005）。相反，如果不能有效地附着在微管上，造成 *Wolbachia* 在细胞中不均匀的分布可能就会导致部分子代 *Wolbachia* 的丢失，比如 *w*Mel 株系的 *Wolbachia* 在白纹伊蚊 Aa23 细胞系中传递不到 12 代就完全丢失（Voronin *et al*., 2010），灰飞虱感染的 *w*Stri 株系在人工转染到褐飞虱中 9 代之后也完全丢失（Kawai *et al*., 2009）。

几种主要稻飞虱整个生命周期中 *Wolbachia* 菌量的变化规律基本呈先上升后下降的动态趋势（Noda *et al*., 2001；Zhang *et al*., 2010；Zhang *et al*., 2012b）。本研究表明，自然种群中，与 *Cardinium* 相比，*Wolbachia* 更容易在成虫中丢失（尤其是雄虫）。这种丢失很可能首先发生在非生殖组织中，如翅、足等（图 1），而在生殖组织中的存在相对稳定。*Wolbachia* 在寄主体内的密度被认为对诱导 CI 的强度有重要影响（Bressac and Rousset, 1993）。同样，在白背飞虱中 *Wolbachia* 的菌量与 CI 的强度有着十分密切的关系，尤其是雄虫体内的 *Wolbachia* 的数量直接影响 CI 的强度（Noda *et al*., 2001）。而 WO 噬菌体是影响 *Wolbachia* 密度的一个最为重要的因子。本文对 *Wolbachia* 及其 WO 噬菌体的研究表明，自然状态下，白背飞虱感染的 *Wolbachia* 中 WO 噬菌体会从溶原性转变为裂解性噬菌体并导致 *Wolbachia* 感染率的降低，并且这种诱发机制明显受到了宿主性别的影响。本研究揭示了胞内共生菌在白背飞虱不同性别成虫体内的感染特性，有助于进一步研究其与宿主的相互作用方式、在宿主中的动态变化规律和诱导不同程度 CI 的机理，对于深入研究胞内共生菌对寄主的生殖调控作用以及正确评估其在生物防治上的潜在应用价值也具有非常重要的理论和现实意义。

判断 WO 噬菌体是否发生了由溶原性向裂解性转变还可以利用透射电镜观察的方法（观察是否有 WO 噬菌体颗粒的存在）。本文中尚未做电镜观察，需要结合白背飞虱不同发育阶段 WO 噬菌体的动态变化规律做进一步的研究。WO 噬菌体作为 *Wolbachia* 基因组中的一种至关重要的可移动元件，被研究者赋予了很多相关的远期研究设想。近期，WO 噬菌体的基因组信息、对 *Wolbachia* 基因组进化的影响、由溶原性向裂解性转变的诱发机制以及与 CI 等 *Wolbachia* 诱导的生殖调控作用的相关性等都是 WO 噬菌体研究的重要方向。

参考文献（References）

Bandi C, McCall JW, Genchi C, Corona S, Venco L, Sacchi L, 1999. Effects of tetracycline on the filarial worms *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* and their bacterial endosymbionts *Wolbachia*.

Intl. J. Parasitol., 29：357－364.

Biliske JA, Batista PD, Grant CL, Harris HL, 2011. The bacteriophage WORiC is the active phage element in wRi of *Drosophila simulans* and represents a conserved class of WO phages. *BMC Microbiol*., 11：251.

Bordenstein SR, Bordenstein SR, 2011. Temperature affects the tripartite interactions between bacteriophage WO, *Wolbachia*, and cytoplasmic incompatibility. *PLoS ONE*, 6(12)：e29106.

Bordenstein SR, Marshall ML, Fry AJ, Kim U, Wernegreen JJ, 2006. The tripartite associations between bacteriophage, *Wolbachia*, and arthropods. *PLoS Pathog*., 2(5)：e43.

Bourtzis K, Nirgianaki A, Markakis G, Savakis C, 1996. *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* species. *Genetics*, 144：1063－1073.

Braig HR, Guzman H, Tesh RB, O'Neill SL, 1994. Replacement of the natural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila simulans* with a mosquito counterpart. *Nature*, 367：453－455.

Breeuwer JAJ, Jacobs G, 1996. *Wolbachia*：intracellular manipulators of mite reproduction. *Exp. Appl. Acarol*., 20：421－434.

Bressac C, Rousset F, 1993. The reproductive incompatibility system in *Drosophila simulans*：DAPI-staining analysis of the *Wolbachia* symbionts in sperm cysts. *J. Invertebr. Pathol*., 61：226－230.

Chafee ME, Zecher CN, Gourley ML, Schmidt VT, Chen JH, Bordenstein SR, Clark ME, Bordenstein SR, 2011. Decoupling of host-symbiont-phage coadaptations following transfer between insect species. *Genetics*, 187(1)：203－215.

Chevalier F, Herbinière-Gaboreau J, Bertaux J, Raimond M, Morel F, Bouchon D, Grève P, Braquart-Varnier C, 2011. The immune cellular effectors of terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*：meeting with their invaders, *Wolbachia*. *PLoS ONE*, 6(4)：e18531.

Dobson SL, Bourtzis K, Braig HR, Jones BF, Zhou W, Rousset F, O'Neill SL, 1999. *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 29：153－160.

Ferree PM, Frydman HM, Li JM, Cao J, Wieschaus E, Sullivan W, 2005. *Wolbachia* utilizes host microtubules and Dynein for anterior localization in the *Drosophila* oocyte. *PLoS Pathog*., 1(2)：e14.

Gan BY, Zhou WG, Feng LB, Shen DL, Li CB, 2002. Infection of *Wolbachia* in three planthopper species in China. *Acta Entomologica Sinica*, 45(1)：14－17. [甘波谊，周伟国，冯丽冰，沈大棱，李昌本，2002. 沃尔巴克氏体在中国三种稻飞虱中的感染. 昆虫学报，45(1)：14－17]

Grenier S, Pintureau B, Heddi A, Lassabliere F, Jager C, Louis C, Khatchadourian C, 1998. Successful horizontal transfer of *Wolbachia* symbionts between *Trichogramma* wasps. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci*., 265：1441－1445.

Harris LR, Kelly SE, Hunter MS, Perlman SJ, 2010. Population dynamics and rapid spread of *Cardinium*, a bacterial endosymbiont causing cytoplasmic incompatibility in *Encarsia pergandiella* (Hymenoptera：Aphelinidae). *Heredity*, 104：239－246.

Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson PH, Muzzi F, Greenfield M, Durkan M, Leong YS, Dong Y, Cook H, Axford J, Callahan AG, Kenny N, Omodei C, McGraw EA, Ryan PA, Ritchie SA, Turelli M, O'Neill SL, 2011. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature*, 476：454－457.

Hoffmann AA, Turelli M, 1997. Cytoplasmic incompatibility in insects. In：O'Neill SL, Hoffmann AA, Werren JH eds. Influential Passengers：Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction. Oxford University Press, New York. 42－80.

Hosokawa T, Koga R, Kikuchi Y, Meng XY, Fukatsu T, 2010. *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(2)：769－774.

Hurst LD, 1991. The incidences and evolution of cytoplasmic male killers. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci*., 244：91－99.

Jeyaprakash A, Hoy MA, 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification：*wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol. Biol*., 9(4)：393－405.

Kawai S, Matsumoto Y, Gotoh T, Noda H, 2009. Transinfection of *Wolbachia* in planthoppers：nymphal injection of cultured *Wolbachia* and infection dynamics. *Environ. Entomol*., 38(6)：1626－1633.

Kent BN, Funkhouser LJ, Setia S, Bordenstein SR, 2011. Evolutionary genomics of a temperate bacteriophage in an obligate intracellular bacteria (*Wolbachia*). *PLoS ONE*, 6(9)：e24984.

Kittayapong P, Jamnongluk W, Thipaksorn A, Milne JR, Sindhusake C, 2003. *Wolbachia* infection complexity among insects in the tropical rice-field community. *Mol. Ecol*., 12：1049－1060.

Masui S, Kamoda S, Sasaki T, Ishikawa H, 2000. Distribution and evolution of bacteriophage WO in *Wolbachia*, the endosymbiont causing sexual alterations in arthropods. *J. Mol. Evol*., 51：491－497.

McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN, Fong AWC, Sidhu M, Wang YF, O'Neill SL, 2009. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*, 323：141－144.

Min KT, Benzer S, 1997. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94：10792－10796.

Noda H, Miyoshi T, Zhang Q, Watanabe K, Deng K, Hoshizaki S, 2001. *Wolbachia* infection shared among planthoppers (Homoptera：Delphacidae) and their endoparasite (Strepsiptera：Elenchidae)：a probable case of interspecies transmission. *Mol. Ecol*., 10：2101－2106.

O'Neill SL, Giordano R, Colbert AME, Karr TL, Robertson HM, 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89：2699－2702.

Rigaud T, SoutyGrosset C, Raimond R, Mocquard JR, Juchault P, 1991. Feminizing endocytobiosis in the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare* Latr. (Isopoda)：recent acquisitions. *Endocytobiosis Cell Res*., 7：259－273.

Ruang-areerate T, Kittayapong P, 2006. *Wolbachia* transinfection in *Aedes aegypti*：a potential gene driver of dengue vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103：12534－12539.

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene

sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 87: 651 – 701.

Stouthamer R, Breeuwer JAJ, Hurst GDD, 1999. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu. Rev. Microbiol.*, 53: 71 – 102.

Stouthamer R, Breeuwer JAJ, Luck RF, Werren JH, 1993. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature*, 361: 66 – 68.

Voronin D, Tran-Van V, Potier P, Mavingui P, 2010. Transinfection and growth discrepancy of *Drosophila Wolbachia* strain *w*Mel in cell lines of the mosquito *Aedes albopictus*. *J. Appl. Microbiol.*, 108(6): 2133 – 2141.

Weeks AR, Marec F, Breeuwer JAJ, 2001. A mite species that consists entirely of haploid females. *Science*, 292: 2479 – 2482.

Weeks AR, Velten R, Stouthamer R, 2003. Incidence of a new sex-ratio-distorting endosymbiotic bacterium among arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 270: 1857 – 1865.

Werren JH, Zhang W, Guo LR, 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 261: 55 – 63.

Xi ZY, Khoo CCH, Dobson SL, 2006. Interspecific transfer of *Wolbachia* into the mosquito disease vector *Aedes albopictus*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 273: 1317 – 1322.

Zchori-Fein E, Gottlieb Y, Kelly SE, Brown JK, Wilson JM, Karr TL, Hunter MS, 2001. A newly discovered bacterium associated with parthenogenesis and a change in host selection behavior in parasitoid wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 12555 – 12560.

Zhang H, Zhang KJ, Hong XY, 2010. Population dynamics of noncytoplasmic incompatibility-inducing *Wolbachia* in *Nilaparvata lugens* and its effects on host adult life span and female fitness. *Environ. Entomol.*, 39(6): 1801 – 1809.

Zhang KJ, Han X, Hong XY, 2012a. Various infection status and molecular evidence for horizontal transmission and recombination of *Wolbachia* and *Cardinium* among rice planthoppers and related species. *Insect Science*, doi/10. 1111/j. 1744 – 7917. 2012. 01537. x

Zhang KJ, Xie RR, Hong XY, 2010. Research progress of endosymbiont *Cardinium*. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 33(5): 1 – 11. [张开军, 谢蓉蓉, 洪晓月, 2010. 胞内共生菌 *Cardinium* 的研究进展. 南京农业大学学报, 33(5): 1 – 11]

Zhang XF, Zhao DX, Hong XY, 2012b. *Cardinium* – the leading factor of cytoplasmic incompatibility in the planthopper *Sogatella furcifera* doubly infected with *Wolbachia* and *Cardinium*. *Environ. Entomol.*, 41(4): 833 – 840.

Zhou LL, Zhang KJ, Song ZW, Hong XY, 2010. Relationship of WO phage and *Wolbachia* infection in *Laodelphax striatellus* (Fallén) (Hemiptera: Delphacidae). *Acta Entomologica Sinica*, 53(9): 978 – 984. [周丽丽, 张开军, 宋子伟, 洪晓月, 2010. 灰飞虱体内 WO 噬菌体和 *Wolbachia* 的侵染关系. 昆虫学报, 53(9): 978 – 984]

Zhou WG, Rousset F, O'Neill SL, 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 265: 509 – 515.

Zhu LY, Zhang KJ, Zhang YK, Ge C, Gotoh T, Hong XY, 2012. *Wolbachia* strengthens *Cardinium*-induced cytoplasmic incompatibility in the spider mite *Tetranychus piercei* McGregor. *Curr. Microbiol.*, 65(5): 516 – 523.

(责任编辑: 武晓颖)